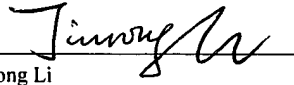


#3

PATENT
Docket No. 472552000100

CERTIFICATE OF HAND DELIVERY

I hereby certify that this correspondence is being hand filed with the United States Patent and Trademark Office in Washington, D.C. on April 13, 2000.


Jinrong Li

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In the application of:

Katsuya Daimon et al.

Serial No.: to be assigned

Filing Date: April 13, 2000

For: METHOD OF EXTRACTING NUCLEIC
ACIDS USING PARTICULATE
CARRIER

Examiner: to be assigned

Group Art Unit: to be assigned

JCS30 U.S. PTO
09/548717
04/13/00

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Under the provisions of 35 USC 119, applicants hereby claim the benefit of the filing of Japanese patent application No. 11-106868 filed April 14, 1999.

The certified priority document is attached to perfect applicants' claim for priority.

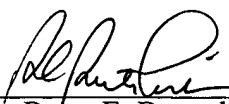
It is respectfully requested that the receipt of the certified copy attached hereto be acknowledged in this application.

In the event that the transmittal letter is separated from this document and the Patent and Trademark Office determines that an extension and/or other relief is required, applicant petitions

for any required relief including extensions of time and authorizes the Assistant Commissioner to charge the cost of such petitions and/or other fees due in connection with the filing of this document to **Deposit Account No. 03-1952**. However, the Assistant Commissioner is not authorized to charge the cost of the issue fee to the Deposit Account.

Dated: April 13, 2000

Respectfully submitted,

By: 
Barry E. Bretschneider
Registration No. 28,055

Morrison & Foerster LLP
2000 Pennsylvania Avenue, N.W.
Washington, D.C. 20006-1888
Telephone: (202) 887-1545
Facsimile: (202) 887-0763

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 9 年 4 月 1 4 日

出 願 番 号
Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 1 0 6 8 6 8 号

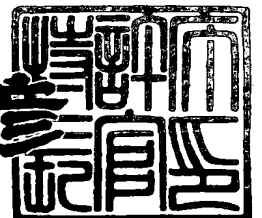
出 願 人
Applicant (s):

東洋紡績株式会社

2 0 0 0 年 1 月 1 4 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平 1 1 - 3 0 9 3 4 9 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 CN99-0250

【提出日】 平成11年 4月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡績株式会社
総合研究所内

【氏名】 大門 克哉

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡績株式会社
総合研究所内

【氏名】 駒井 茂

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡績株式会社
総合研究所内

【氏名】 宝田 裕

【特許出願人】

【識別番号】 000003160

【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【代表者】 柴田 稔

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 000619

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 粒子担体を使用した核酸の抽出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 核酸に対して結合性を有する粒子担体を用いて核酸を含有すると考えられる材料からの核酸の抽出方法において、該粒子担体が $0.5 \sim 15.0 \mu\text{m}$ の粒子直径、 $50 \sim 500 \text{ nm}$ の細孔直径、および $200 \sim 5000 \text{ mm}^3/\text{g}$ の細孔容積を有することを特徴とする核酸の抽出方法。

【請求項 2】 粒子担体がシリカまたはその誘導体を含有する粒子担体である請求項 1 記載の核酸の抽出方法。

【請求項 3】 シリカまたはその誘導体を含有する粒子担体が磁性を有する粒子担体である請求項 2 記載の核酸の抽出方法。

【請求項 4】 磁性を有する粒子担体が超常磁性金属酸化物を含有する粒子担体である請求項 3 記載の核酸の抽出方法。

【請求項 5】 超常磁性金属酸化物として $10 \sim 50\%$ の酸化鉄を含有する粒子担体を用いる請求項 3 または 4 に記載の核酸の抽出方法。

【請求項 6】 $5 \text{ m}^2/\text{g}$ 以上の外部表面積を有する粒子担体を用いる請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の核酸の抽出方法。

【請求項 7】 $5 \sim 800 \text{ m}^2/\text{g}$ の比表面積を有する粒子担体を用いる請求項 6 記載の核酸の抽出方法。

【請求項 8】 核酸を抽出および単離するための方法であって、(a) 核酸を含むと考えられる材料、核酸に対して結合性を有し、 $0.5 \sim 15.0 \mu\text{m}$ の粒子直径、 $50 \sim 500 \text{ nm}$ の細孔直径、 $200 \sim 5000 \text{ mm}^3/\text{g}$ の細孔容積を有する粒子担体、および核酸を該粒子担体に吸着せしめるための核酸抽出溶液とを混合する工程、

(b) 核酸以外のものを、核酸および粒子担体との複合体より洗浄液を用いて洗浄することにより除去する工程、

(c) 核酸および粒子担体との複合体より核酸を溶出して回収する工程、を含むことを特徴とする核酸の抽出方法。

【請求項 9】 核酸が DNA および／または RNA である請求項 1 ～ 8 のい

ずれかに記載の核酸の抽出方法。

【請求項 10】 核酸を含有すると考えられる材料が生物材料である請求項 1～9 のいずれかに記載の核酸の抽出方法。

【請求項 11】 生物材料が、血液、組織、尿、喀痰のいずれかである請求項 9 記載の核酸の抽出方法。

【請求項 12】 核酸抽出溶液がカオトロピック物質を含有する請求項 8 記載の核酸の抽出方法。

【請求項 13】 カオトロピック物質として、グアニジン塩、ヨウ化カリウム、ヨウ化ナトリウム、(イソ)チオシアン酸塩、尿素よりなる群から選ばれる少なくとも 1 種の化合物を含む核酸抽出溶液を用いる請求項 12 記載の核酸の抽出方法。

【請求項 14】 カオトロピック物質として、グアニジン(イソ)チオシアン酸塩および／またはグアニジン塩酸塩を含む核酸抽出溶液を用いる請求項 12 記載の核酸の抽出方法。

【請求項 15】 核酸以外のものを洗浄により除去する工程中において用いられる洗浄液として、カオトロピック物質を含む第一の洗浄液およびアルコールを含む第二の洗浄液を使用する請求項 8 記載の核酸の抽出方法。

【請求項 16】 第一の洗浄液中に、カオトロピック物質として、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン塩酸塩および／またはチオシアン酸ナトリウム塩を含有する請求項 15 記載の核酸の抽出方法。

【請求項 17】 第二の洗浄液中に、60～100%濃度のアルコールを含有する請求項 15 または 16 に記載の核酸の抽出方法。

【請求項 18】 核酸以外のものを洗浄により除去する工程中において用いられる洗浄液として、70%濃度のエタノールを含む洗浄液および99%濃度のエタノールを含む洗浄液を用いる請求項 8 記載の核酸の抽出方法。

【請求項 19】 核酸を増幅するための方法であって、該方法が請求項 1～18 のいずれかに記載の方法により抽出された核酸を用いて、増幅反応により標的核酸を増幅せしめた後、該標的核酸その存在を確認することを特徴とする核酸の検出方法。

【請求項 20】 増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応である請求項 19 記載の核酸の検出方法。

【請求項 21】 増幅反応が核酸配列に基づく増幅法である請求項 19 記載の核酸の検出方法。

【請求項 22】 核酸ハイブリダイゼーション法により標的核酸を検出する請求項 19～21 のいずれかに記載の核酸の検出方法。

【請求項 23】 核酸結合性磁性担体、核酸を核酸結合性担体に吸着せしめるための核酸抽出溶液および核酸結合性担体-核酸複合体から核酸を溶出せしめるための核酸溶出溶液とを含んでなることを特徴とする請求項 1～18 のいずれかに記載の核酸抽出用テストキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸に対して結合性を有する粒子担体を使用して核酸を含有すると考えられる材料から核酸を抽出し単離する方法に関する。より詳細には、該粒子担体が、 $0.5 \sim 15.0 \mu\text{m}$ の粒子直径、 $50 \sim 500 \text{ nm}$ の細孔直径および $200 \sim 5000 \text{ mm}^3/\text{g}$ の細孔容積とを有する粒子担体を用いることを特徴とする核酸の抽出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年の遺伝子工学や分子生物学等の分野の進歩により、感染症や遺伝子疾患等について、DNA/RNA レベルで解析することが可能になった。特に、ポリメラーゼ連鎖反応（以下、PCR 法という；Science 第 230 巻、第 1350～1354 頁、1985 年）や、核酸配列に基づく増幅法（以下、NASBA 法という；Nature 第 350 頁、第 91～92 頁（1991 年）、特許第 2648802 号公報および特許第 2650159 号公報）等に代表される核酸増幅方法の発明により、従来であれば検出が非常に困難であった極微量の核酸の検出が可能となり、遺伝子解析が飛躍的に容易なものとなった。

【0003】

ただし、生物試料中の核酸を、必要であれば増幅し、検出するためには、試料中の核酸を選択的に取り出す必要がある。これは、通常の生物試料中には核酸以外の夾雑物質、例えばタンパク質、脂質、糖類などが大量に含まれており、これらが増幅や検出に悪影響を及ぼす可能性が少なくない。そのため、予め試料中の夾雑物質を除き、核酸を抽出し単離する操作が必要となる。

【0004】

このような核酸の単離方法は古くから様々な手法で行われてきた。代表的なものとして、フェノール／クロロホルム抽出法 (Biochimica et Biophysica acta 第72巻、第619～629頁、1963年)、アルカリSDS法 (Nucleic Acid Research 第7巻、第1513～1523頁、1979年) 等の液相で行う方法がある。これらは実験室スケールで汎用されるが、有害で廃棄の困難なフェノールやクロロホルムのような有機溶剤の他、危険物である水酸化ナトリウムなどを使用するため、技術的には熟練を要し、再現性良く実施することは容易でない。

【0005】

また、核酸の単離に核酸結合用担体を用いる系としては、ガラス粒子とヨウ化ナトリウム溶液を使用する方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第76-2巻、第615～619頁、1979年)、ハイドロキシアパタイトを用いる方法 (特開昭63-263093号公報) 等がある。これらの方法は有害な有機溶剤等は使用しないものの、工程中に遠心分離操作を多く含むため、多数の試料を一度に処理することが困難で、核酸を単離するのに長時間かかるという問題を含んでいる。

【0006】

従って、上記のような核酸単離方法は有機溶剤やアルカリなどの危険な試薬を使用すること、遠心分離操作を必要とし、多数検体の処理が難しいことなどの難点がある。そしてさらに、抽出および単離工程の自動機械化に際しては大きな問題が生じる。多数の検体を再現性良く処理し、更に人的コストを低減させるためには、核酸抽出および単離法の自動化は今後不可欠になる。

【0007】

この自動機械化を目指したものとして、シリカ粒子とカオトロピックイオンを用いた方法（J.Clinical Microbiology 第 2 8 - 3 巻、第 4 9 5 ~ 5 0 3 頁、1 9 9 0 年、特開平 2 - 2 8 9 5 9 6 号公報）がある。この方法は、核酸結合性のシリカ粒子と、試料中の核酸を遊離する能力を持つカオトロピックイオンとを試料と混合し、核酸をシリカ粒子に結合させ、夾雑物質を洗浄により除去した後、シリカ粒子に結合した核酸を回収するものである。本方法は DNA に加えてより不安定である RNA の抽出にも好適であり、また純度の高い核酸が得られるという点で非常に優れている。ただしこの核酸が結合した粒子の洗浄については遠心分離またはフィルターなどを使用した濾過などを行う必要があり、機械化の際に工程が複雑となる恐れが高い。

【 0 0 0 8 】

従って、シリカ粒子を容易に混合・洗浄するために、粒子に磁性を持たせ、磁気により混合および攪拌する方法（特開平 9 - 1 9 2 9 2 号公報）が考えられた。この方法は、核酸を磁性シリカ粒子に結合させ、以下洗浄後回収するもので、機械化の際の工程はより簡便になる。ただし、単に磁性を持たせた粒子を使用するだけでは、検体中の夾雑物質の影響などを受け、回収効率が低下する現象が多くみられる。

【 0 0 0 9 】

その理由としては、粒子の周囲に核酸を吸着させ、不要物を洗浄して除去した後核酸を回収する方法において、夾雑物質が非常に多い場合にはそれが粒子表面を覆ってしまい、核酸の吸着効率が低下するためと推定されている。この問題を解決するために、表面積のより大きい粒子担体を使用する方法（特願平 1 0 - 6 5 6 6 2）や予め粒子担体を界面活性剤で懸濁することにより夾雑物質の吸着を抑える方法（特願平 9 - 3 5 1 1 0 2）が考案されている。にもかかわらず、血液検体特に全血検体のような極めて夾雑物質が多い試料については、十分な抽出量を得ることは困難であった。

【 0 0 1 0 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記の問題点を解決するためになされたものであり、核酸を含有す

と考えられる材料から核酸を抽出および単離する際に、臨床検体のような多量の夾雑物質を含む試料から、効率よく核酸を抽出する方法を提供するものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、これらの課題を解決するべく鋭意研究を進めた結果、粒子担体を使用し生物材料から核酸を抽出し単離する際、臨床検体のような多量の不純物を含む試料から効率よく核酸を抽出するためには、該粒子担体が少なくとも50nmの細孔直径と200mm³/gの細孔容積を有することが有効であることを見出し、本発明に到達した。

【0012】

一般に、多孔質の磁性シリカ粒子担体においては、細孔部分の直径である細孔直径と、粒子内部の容積となる細孔容積が存在する。そして本発明においては、これらの細孔直径と細孔容積が試料中の核酸の回収効率に影響することを見出したものである。

【0013】

すなわち、本発明は、核酸を含有すると考えられる材料から核酸を抽出および単離する際、方法において、該粒子担体が0.5～15.0μmの粒子直径、50～500nmの細孔直径、200～5000mm³/gの細孔容積を有する核酸結合性粒子担体であることを特徴とする核酸の抽出方法である。

また本発明は、下記工程(a)～(c)を含むことを特徴とする核酸の抽出および単離方法である。

(a) 核酸を含むと考えられる材料と、核酸を吸着できる0.5～15.0μmの粒子直径、50～500nmの細孔直径、200～5000mm³/gの細孔容積を有する核酸結合性粒子担体と、核酸を該担体に吸着させるための核酸抽出溶液とを混合する工程、

(b) 核酸以外のものを、核酸と担体との複合体より洗浄することで除去する工程、

(c) 核酸と担体との複合体より核酸を溶出し回収する工程。

【0014】

【発明の実施の形態】

次に本発明において使用する言葉を定義し、その測定法を説明する。

表面積とは、担体の全表面上の面積を示す。また微小径粒子においては、粒子1個当たりの表面積ではなく、単位重量（例えば1g）当たりの表面積で示すことが多く、これを比表面積という。また、外部表面積とは、担体の表面に位置する表面積をいう。

【0015】

細孔とは、粒子表面に存在する微細な空洞を示し、細孔容積とは、細孔により構成される空間の容積を示す。また、表面細孔直径とは、担体上に存在する微小な細孔の直径であり、微小径の粒子では平均の直径がよく用いられる。粒子径とは、分散粒子の形を球形と仮定した場合の直径を示す。

【0016】

すなわち、本発明においては、粒子担体が少なくとも50nmの細孔直径と、 $200\text{mm}^3/\text{g}$ の細孔容積を有することが必要である。細孔直径および細孔容積がより大きい粒子を使用することにより、核酸の回収量を高めることができるのである。細孔直径が50nm未満、細孔容積が $200\text{mm}^3/\text{g}$ 未満であると、試料中の夾雑物質等の影響により、目的とする核酸が粒子表面に結合、吸着できないという問題を生じる。また、粒子直径が $0.5\mu\text{m}$ よりも小さいと、分散性が高くなりすぎて洗浄などの際に粒子担体を集めることが困難になり、 $15.0\mu\text{m}$ よりも大きいと、粒子自体の密度が大きくなり溶液中で迅速に沈殿してしまうので好ましくない。

【0017】

本発明において、粒子の細孔直径および細孔容積についての解析は水銀圧入法により行った。この方法は、水銀はほとんどの物質の細孔壁を濡らさないため強制的に加圧しないと細孔中に水銀が浸入していかないという物理的原理に基づいている。すなわち、試料を取り囲んだ水銀を周囲より一様に圧力をかけ、順次昇圧していくと、水銀は細孔径の比較的大きい細孔から、小さい細孔へと浸入していく。ここで細孔が半径 r の円筒状であると仮定すると、圧力 p をかけて水銀を

押し込もうとする力 $\pi r^2 P$ と、浸入しようとする水銀を外へ押し出そうとする力 $-2\pi r \cdot \gamma \cos \theta$ が平衡になり、水銀は次式で決まる細孔半径 r より大きい細孔に浸入する。

【0018】

$$p r = -2 \gamma \cos \theta \quad (1)$$

ここで、 P ：圧力、 r ：細孔径、 γ ：水銀の表面張力、 θ ：水銀と試料の接触角 ($90^\circ < \theta < 180^\circ$) である。上記(1)式は、Washburn式と呼ばれ、右辺は測定物質固有の定数となり、圧力または細孔半径に対する水銀の浸入量となる。また水銀の浸入量は半径 r より大きい細孔の累積容積を示す。

【0019】

次に、細孔の累積比表面積 S を考える場合、ある細孔半径 r 、深さ l の円筒細孔が n 個存在したとすると、比表面積の増加量は、

$$d S = 2 \pi r l \cdot n \quad (2)$$

また、細孔容積の増加量は、

$$d V = \pi r^2 l \cdot n \quad (3)$$

であり、(2)と(3)式から、

$$d S = (2 / r) d V$$

従って、累積比表面積は、

$$S = (2 / r) \int d V$$

となる。

【0020】

本発明において用いられる粒子担体は、磁性を有する粒子であることが好ましく、磁性シリカまたはその誘導体を含む粒子（以下、磁性シリカ粒子という）であることがさらに好ましい。該磁性シリカ粒子は、以下のような構造を有することが特に好ましい。すなわち、下記に示すような超常磁性金属酸化物の表面がシリカで被覆されており、そして、さらに微小なシリカ粒子で構成される無機多孔性壁物質で複合されている。この磁性シリカ粒子は、ほぼ完全な球状である。核酸とシリカ粒子とは、シリカ表面の水酸基と核酸の塩基との間で生じる水素結合により結合される。

【 0 0 2 1 】

本発明で用いられる超常磁性金属酸化物とは、磁場変化度に応答するが、永久磁化はされず、残留磁化が小さい金属酸化物をいう。好ましい超常磁性金属酸化物としては、酸化鉄が挙げられる。該酸化鉄としては、四三酸化鉄 (Fe_3O_4) および四三酸化鉄を徐々に酸化して得られる r 型三二酸化鉄 ($\text{r Fe}_2\text{O}_3$) などを用いられる。この四三酸化鉄は残留磁気が小さく、さらに好ましい表面構造 (ほぼ球形) を有するため、磁気分離および再分散のサイクルを反復することが可能である。四三酸化鉄を含有する磁性シリカ粒子は弱酸性の水溶液中で安定であり、2 年以上も貯蔵可能である。

【 0 0 2 2 】

本発明の磁性シリカ粒子中に含まれる超常磁性漢族酸化物の重量は、磁極の強さにもよるが、10～60 重量%が好ましく、さらに好ましくは20～40 重量%である。この好ましい範囲内では、磁性担体は市販の磁石を使用して迅速に分離できる。

【 0 0 2 3 】

本発明において、シリカとは SiO_2 結晶および他の形態の酸化ケイ素、 SiO_2 から構成されるケイソウ植物の骨格ならびに無定型酸化ケイ素を含む。磁性シリカ粒子としては、下記性質を有するものが最も好ましい。

- (1) 担体は、超常磁性酸化鉄を含む磁性シリカ粒子である。
- (2) 磁性シリカ粒子の外部表面積は、少なくとも $10 \text{ m}^2/\text{g}$ である。
- (3) 磁性シリカ粒子は、その表面がシリカで被覆されている超常磁性金属酸化物を、微小なシリカ粒子で構成される無機多孔性壁物質で複合してなる。
- (4) 超常磁性酸化鉄の重量は10～60 重量%である。
- (5) 磁性シリカ粒子の比表面積は $10 \sim 800 \text{ m}^2/\text{g}$ である。
- (6) 磁性シリカ粒子の表面細孔直径は $50 \sim 500 \text{ nm}$ である。
- (7) 磁性シリカ粒子の細孔容積は $200 \sim 5000 \text{ mm}^3/\text{g}$ である。
- (8) 磁性シリカ粒子の粒子径は $0.5 \sim 15.0 \mu\text{m}$ である。

【 0 0 2 4 】

本発明の磁性シリカ粒子は、例えば、特開平 6 - 4 7 2 7 3 号公報に記載の方

法により製造され得る。例えば、四三酸化鉄をテトラエトキシシランのアルコール溶液に添加し、超音波分散機により分散湿潤させる。これにテトラエトキシシランの加水分解触媒を加え、超音波分散させながら四三酸化鉄の表面にシリカを沈着させる。このようにして得られた分散液にケイ素ナトリウムを加え、有機溶媒および界面活性剤（ソルビタンモノステアレートのトルエン溶液）を加えて乳化し、W/O型エマルジョンを形成させる。この乳濁液を硫酸アンモニウム水溶液に添加し、十分攪拌する。その後、濾過分離、水洗、アルコール沈殿を行い、乾燥させることにより、所望の球状シリカ粒子が得られる。

【 0 0 2 5 】

本発明における核酸抽出溶液とは、生物試料中の核酸を含む細胞などを破壊し、核酸を露出させ、そして、この核酸を磁性シリカ粒子に結合させる働きを持つ溶液である。このような溶液としては、好ましくは、カオトロピック物質のようなシリカ粒子表面の疎水性を高める物質が選択され、さらに好ましくは、グアニジン（イソ）チオシアン酸塩および／またはグアニジン塩酸塩のような核酸分解酵素の阻害活性を有する化合物の溶液が使用できる。

【 0 0 2 6 】

上記カオトロピック物質としては、具体的には例えば、グアニジンチオシアン酸塩、グアニジン塩酸塩、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、過塩素酸ナトリウム、尿素等が挙げられるが、これらのうち、RNAを分解するリボヌクレアーゼに対する阻害効果の大きなグアニジンチオシアン酸塩あるいはグアニジン塩酸塩の使用が好ましい。これらのカオトロピック物質の使用濃度は、用いられるカオトロピック物質により異なり、通常、1.0～8.0M、好ましくは4.0～7.0Mであり、例えばグアニジン塩酸塩を使用する場合は、好ましくは4.0～7.5Mである。また、グアニジンチオシアン酸塩を使用する場合には、好ましくは3.0～5.5Mの範囲である。

【 0 0 2 7 】

本発明の核酸抽出溶液には、緩衝剤を含有させることが好ましい。これは予め抽出溶液に含まれていても、また、細胞を溶解した後に緩衝液として添加してもよい。該緩衝剤としては、一般に使用されるものであれば、特に限定されないが

、中性付近、すなわち pH 5.0～9.0 において緩衝能を有するものが好ましい。例えば、トリス塩酸塩、四ホウ酸ナトリウム塩酸、リン酸二水素カリウム四ホウ酸ナトリウム緩衝液等が挙げられる。その使用濃度としては 1～50 mM、pH は 6.0～9.0 の範囲が好適である。

【0028】

また、該核酸抽出溶液には、細胞膜の破壊あるいは細胞中に含まれるタンパク質を変性させる目的で界面活性剤を含有させてもよい。該界面活性剤としては、一般に細胞等からの核酸抽出に使用されるものであれば、特に限定されないが、具体的には、トリトン系界面活性剤および Tween 系界面活性剤等の非イオン界面活性剤、N-ラウロイルサルコシンナトリウム等の陰イオン界面活性剤が挙げられる。本発明においては、特に非イオン界面活性剤を 0.1～2.0% の範囲で使用するのが好ましい。

【0029】

さらに、核酸抽出溶液には試料中に含まれるタンパク質、特にリボヌクレアーゼを変性、失活させる目的で、2-メルカプトエタノールあるいはジチオスレイトール等の還元剤を含有させることが好ましい。

【0030】

本発明において使用される洗浄液は、核酸結合性担体から核酸の溶離を促進することなく、かつタンパク質、糖類、脂質の固相への結合を妨げるものであれば特に限定されない。具体的には、例えば、4.0～7.5 M グアニジン塩酸塩溶液および／または 40～100% より好ましくは 60～100% のアルコールで洗浄することが挙げられる。該アルコールとしては、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール等が好ましい。なかでも、エタノールが好ましい。また、初めに溶解・吸着工程にて使用した抽出溶液を洗浄液として用いると、ゲノム DNA とタンパク質の除去に効果的である。このとき、続いて 40～100% エタノールで洗浄することが好ましい。さらに、2 種以上の異なるアルコール濃度の洗浄液を用いることはより効果的であり、例えば、70% 濃度および 99% 濃度のエタノールにより洗浄するのが好ましい。

【0031】

本発明における核酸の結合した核酸結合性担体から核酸を溶出する核酸溶出液とは、核酸結合性担体から核酸の溶離を促進するものであれば特に限定されない。具体的には、水あるいはTE緩衝液（10 mM トリス-塩酸塩、1.0 mM EDTA；pH 8.0）が好ましい。

【0032】

この核酸-磁性シリカ粒子複合体を形成する際、夾雑物を多量に含む生物試料、例えば血液のような検体を処理する場合、該生物試料由来の物質が磁性シリカ粒子の周囲に付着し、核酸の結合を妨げる傾向にある。実際、夾雑物が多い試料ほど核酸の回収能力が低下する。この問題を解決するため、本発明においては、細孔直径および細孔容積がより大きい粒子を使用することにより、上記試料由来の夾雑物質が粒子に付着しても、核酸の結合に影響が出にくく、従って高い回収率を維持することが可能となる。

【0033】

本発明の核酸抽出用試薬キットは、少なくとも上記核酸結合性磁性担体、核酸を核酸結合性担体に吸着させるための核酸抽出溶液および核酸結合性担体-核酸複合体から核酸を溶出するための核酸溶出溶液を含む。より詳細には、例えば、(1)超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子である核酸結合性磁性担体であって、該磁性シリカ粒子が50～500 nmの細孔直径と、200～5000 mm³/gの細孔容積を有する核酸結合性磁性担体、(2)核酸を核粒子に吸着させるための溶液、および(3)核酸を溶出するための溶液とを少なくとも含む。その組成比は、使用目的に応じて種々に選択されるが、その一例としては、(1)約1～200 μl、(2)約0.1～10.0 ml および(3)約10～500 μlである。

【0034】

本発明においては、このような磁性シリカ粒子を、核酸を含むと考えられる材料とともに核酸吸着用溶液中に添加し、磁性シリカ粒子-核酸複合体を形成する。本発明の核酸単離方法は、具体的には下記工程を含む。

(a) 核酸結合性担体、核酸を含有する試料および核酸を核酸結合性担体に吸着させるための核酸抽出溶液を混合して、核酸を核酸結合性担体に結合させる工程（吸着工程）、

(b) 核酸が結合した核酸結合性担体を液体から分離し、必要により洗浄する工程（分離工程）、および、

(c) 核酸結合性担体－核酸複合体から核酸を溶出する工程（溶出工程）。

ここで、核酸を含むと考えられる材料とは、全血、血清、血漿、尿、唾液、体液などの動物由来の生物材料、その他、植物、微生物などの動物以外の生物材料等を包含する。また、これらの生物から分離した細胞および培養細胞を含む。さらに、部分精製された核酸も包含する。

【 0 0 3 5 】

本発明において、核酸とはDNAまたはRNAを意味し、DNAとしては、2本鎖DNA、1本鎖DNA、プラスミドDNA、ゲノムDNA、cDNAなどを含む。また、RNAとしては、ウイルス、細菌あるいは真菌等の外来性寄生生物由来のRNAに加えて、これらの生物材料を産する生物に由来する内在性のRNAを含み、tRNA、mRNA、rRNAなどを含む。

【 0 0 3 6 】

本発明の(a)吸着工程においては、核酸結合性担体、核酸を含有する試料および核酸抽出溶液を混合し、核酸を核酸結合性担体に吸着させる。混合方法は、ボルテックスによる攪拌、転倒混和、磁気による攪拌などがあり、混合時間は約1～60分間である。これらの物質を混合することにより、試料中の核酸、タンパク質、糖類などが核酸結合性担体に物理的に吸着する。

(b) 分離工程における液相と核酸結合性担体との分離手段としては、粒子内の超常磁性金属酸化物を使用することによる、磁石等を用いた簡便な磁気分離法が可能である。該分離工程においては、必要により洗浄を行い、不要なタンパク質、糖類、脂質などを溶離する。洗浄は1回または2回以上行う。

(c) 溶出工程は、上記(b)工程における核酸が吸着した核酸結合性担体から該核酸を溶出する工程である。このとき回収した核酸は、透析やエタノール沈殿法等の脱塩、濃縮操作を施すことなく、制限酵素やDNAポリメラーゼ等を使用する酵素反応に直接使用することができる。また、必要によりPCR法、NASBA法などにより増幅した後、核酸プローブ試薬を使用して、例えば核酸ハイブリダイゼーション法により目的核酸を検出することもできる。

【0037】

【実施例】

以下に、本発明の実施例を挙げることにより、本発明の効果をより一層明瞭なものとする。ただし、これらの実施例によって本発明は特に限定されるものではない。

【0038】

実施例 1（試料中の核酸の抽出）

磁性シリカ粒子としては、細孔直径が1～200nm、細孔容積が40～2200mm³/g程度まで異なる粒子を4種類準備した。このうち粒子Aおよび粒子Bは本発明の要件を満たすもの、また粒子Cおよび粒子Dは従来型粒子で細孔直径と細孔容積が小さいものである。このほか、これらはすべて平均粒子径の範囲が1.0～5.0μm、四三酸化鉄粒子の含有量がグラム重量あたり30%である。まず、0.1mg/ml濃度になるように5.0MのNaCl溶液に懸濁した磁性シリカ粒子を準備した。各ロット中の磁性シリカ粒子の性質を表1に示す。

【0039】

【表1】

各磁性シリカ粒子の性質

	粒子A (E03)	粒子B (E11)	粒子C (Lot4)	粒子D (Lot8)
細孔直径 (nm)	193.0	98.0	1.08	2.12
細孔容積 (mm ³ /g)	418.0	2119.0	116.0	41.7
平均粒子径 (μm)	4.80	1.88	4.80	3.06

【0040】

被験試料としては、耐熱性毒素TDH (Thermostable Direct Haemolysin) を産生する腸炎ビブリオ菌体陽性の全血検体を使用した。また核酸抽出用溶液としては、以下の組成のものを使用した。

50 mM Tris-HCl

5.0 M グアニジンチオシアン酸塩

20 mM EDTA

1.2% Polyethylene Glycol mono-p-isooctylphenyl Ether

【0041】

本実施例の具体的な操作は次の通りである。

(1) 1.5 ml 容のエッペンドルフチューブに、上記の組成を持つ核酸抽出用試薬 0.9 ml を入れ、次に核酸を含有すると考えられる生物試料 0.1 ml を添加し、よく混合した。

(2) 次に、5.0 M の NaCl 溶液に懸濁した磁性シリカ粒子担体 50.0 μ l を加え、よく混合し室温で 10 分間放置した。この間 2 分おきに混合した。

(3) 遠心分離機を使用して 12000 rpm で 1 分間遠心することにより、粒子をチューブ底部に集めた。

(4) フィルターチップ又はディスポーザブルスポイトを用いて、溶液相を静かに吸引排出した。

(5) ここに、洗浄液として 5.0 M のチオシアン酸ナトリウム塩を含むトリス／塩酸緩衝液 1.0 ml を加えて混合した後、上記(3)と同様にして遠心分離した。

。

(6) 上記(4)と同様に溶液を排出し、洗浄液による洗浄操作をもう一度繰り返した。

(7) 1.0 ml の 70% エタノール溶液により上記(5)から(6)と同様に、核酸の吸着したシリカ粒子を洗浄し、高濃度の塩溶液を除去した。

(8) 再度 1.0 ml の 70% エタノール溶液で洗浄した後、1.0 ml の 99% エタノールで同様に洗浄した。

(9) 56.0℃ のヒートブロック上に上記のチューブを設置し、約 30 分間静置することにより、チューブ内およびシリカ粒子中のエタノールを完全に蒸発させて除去した。

(10) 0.1 ml の滅菌水を加え、56.0℃ のヒートブロック上に上記チューブを静置し 10 分間静置した。

(11) 12000rpmで5分間遠心分離することにより粒子をチューブ底部に集め、次いで溶液相をフィルターチップで吸引し、別の新しいチューブに回収した。回収液量は通常60～70 μ l程度である。

【0042】

実施例2（腸炎ビブリオTDH遺伝子の増幅）

次に、この回収した核酸をNASBA法（Nature 第350巻、第91～92頁（1991年）、特許第2648802号公報および特許第2650159号公報）により増幅した。増幅反応は腸炎ビブリオTDH遺伝子の配列中より最適な配列を有する増幅用プライマーを使用した。5'側プライマーの塩基配列が、5'-CCCCGGTTCT GATGAGATAT TGTT-3'（配列番号1）、3'側プライマーの塩基配列が、5'-AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC AATATATTAC CACTACCACT A-3'（配列番号2、T7-RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む）である。これらのプライマー配列は特開平4-20299号公報およびGene第93巻、第9～15頁（1993年）に開示されたものである。またNASBA法は、T7-RNAポリメラーゼ、逆転写酵素およびRNase H（一重鎖または二重鎖RNAまたはDNAを加水分解することなくRNA-DNAハイブリッドのRNAを加水分解するリボヌクレアーゼ）を用いた。

【0043】

NASBA増幅法による高濃度核酸配列の調製は、まず下記の増幅反応液10.0 μ lに、実施例1の方法により抽出、単離したTDH遺伝子核酸溶液5.0 μ lを加え、65℃で5分間静置した。そして41℃に反応温度を下げ、その後下記の酵素溶液5.0 μ lを加えた。その後、41℃で90分間静置した。

【0044】

以下に、増幅反応液の組成を示す。

40.0mM Tris-HCl

12.0mM MgCl₂

70.0mM KCl

5.0mM DTT（ジチオスレイトール）

15%（v/v） DMSO（ジメチルスルホキシド）

1. 0 mM dNTP
2. 0 mM rNTP
- 0.2 μ M プライマー \times 2

【0045】

以下に、酵素液の組成を示す。

- 0.1 U RNase H
- 40.0 U T7-RNAポリメラーゼ
- 8.0 U 逆転写酵素
- 0.1 g/l BSA (牛血清アルブミン)

【0046】

実施例3 (増幅した核酸溶液の検出)

以上の手順により得られた増幅核酸溶液を、核酸量評価のため検出に用いた。

核酸のサンドイッチハイブリダイゼーション法により、腸炎ビブリオTDH遺伝子の検出を行った。

〔TDH遺伝子検出用捕捉プローブおよび標識プローブの合成〕

捕捉プローブおよび標識プローブは、DNAシンセサイザー391型（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ホスホアミダイト法により合成した。捕捉プローブの塩基配列は、5'-CGGTCATTCT GCTGTGTTTCG TAAAAAT-3'（配列番号3）、標識プローブの塩基配列は、5'-CAGGTACTAA AXGGTTCACA TCCTA（配列番号4）である。標識プローブの配列中Xは、5'位にリンカーアームを有するウリジンを示す。これらのプローブは特開平4-20299号公報及びGene第93巻、第9～15頁（1993年）に開示されたものである。

【0047】

〔標識プローブの酵素（アルカリフォスファターゼ）標識〕

合成標識プローブと、そのリンカーアームを介してのアルカリフォスファターゼとの結合を、文献（Nucleic Acids Research 第14巻、第6155頁（1986年））に従って行った。

【0048】

〔捕捉プローブ-固相の調製法〕

固相はポリスチレン製のマイクロタイタープレート（マイクロライト2、ダイナテック社製）を用い、上記方法で得られた捕捉プローブを、マイクロタイタープレートのウェルに100 μ lずつ分注し、25℃で一夜インキュベートし、捕捉プローブをプレートに結合させた後、デオキシリボヌクレオチド三リン酸によりブロッキングを行った。

【0049】

〔サンドイッチハイブリダイゼーション法による核酸の検出〕

以上の方法で調製した試薬および試料を用いて、核酸溶液の検出を以下に述べる方法で行った。

得られた核酸溶液を、水酸化ナトリウム溶液で処理して変性させた。そして上記プレートに、変性させた試料を2.0 μ l、ハイブリダイゼーション緩衝液を50.0 μ l、アルカリフォスファターゼ標識プローブ溶液を50.0 μ l加え、50℃で30分間ハイブリダイゼーションを行った。ウェルから液を除き、1.0%ラウリル硫酸ナトリウムを含む洗浄液1を200 μ l加え、50℃で5分間洗浄し、次に0.5% Polyethylene Glycol mono-p-isooctylphenyl Etherを含む洗浄液2を200 μ l加え室温で5分間洗浄、さらに1×SSC溶液200 μ lで洗浄した。そして、アルカリフォスファターゼの基質であるLumiphos 480（和光純薬社製）を100 μ l加え、37℃で15分間酵素反応を行った後、発光量をマイクロライト1000（ダイナテック社製）で測定した。実施例1～3の結果を以下の表2に示す。

【0050】

【表2】

各磁性シリカ粒子による核酸測定量の比較

希釈系列	粒子A	粒子B	粒子C	粒子D
10 ⁻⁵	14.2	23.9	0.7	0.6
10 ⁻⁴	28.7	81.1	4.3	0.5
10 ⁻³	665.1	1,992.1	43.1	44.5

発光料 (r l u)

【0051】

表2から明白なように、本発明の粒子である粒子Aおよび粒子Bを使用した場合には、従来型粒子である粒子C及び粒子Dと比較して格段の差がみられる。 10^{-3} 希釈付近の核酸量の多い試料においては、より高い測定値を示している。また、 10^{-5} 希釈付近の低濃度域でも、粒子Aおよび粒子Bではシグナルがみられるが、粒子C及び粒子Dでは、ブランクとほぼ同じ程度のシグナル（1.0 r l u以下）であり、検出感度に差があることがわかる。

【0052】

実施例4（各磁性粒子と核酸回収量の比較）

上記と同様、粒子A～Dを使用し、予め増幅することで数的に増大させた核酸溶液を用いて、実施例1の方法で核酸を抽出し、実施例3の方法で検出量を測定した。被験試料としては、実施例2の方法（NASBA法）で増幅したTDH遺伝子の核酸溶液を使用した。また検体として、TDH遺伝子陰性の血清サンプルならびに全血サンプルを用い、ここに増幅核酸溶液を添加したものをを使用した。そして、抽出および検出した核酸の検出量を添加した核酸量の検出値で割ることにより、回収率として算出した。ここで全ての評価は2テストずつ実施した。実施例4の結果を表3に示す。

【0053】

【表3】

各磁性シリカ粒子による核酸測定量の比較

	粒子A	粒子B	粒子C	粒子D
血清サンプル 1	65.1	64.3	24.9	31.0
血清サンプル 2	64.4	58.7	29.3	26.9
全血サンプル 1	30.9	31.1	3.92	1.93
全血サンプル 2	25.5	36.9	2.56	1.51

回収率(%)

【 0 0 5 4 】

表 3 から明白なように、本発明の粒子を使用することにより、核酸の回収効率は飛躍的に向上した。本発明の粒子 A および粒子 B では、血清サンプルでの評価において従来型粒子（粒子 C および粒子 D）の約 2 倍の回収効率を示している。また全血サンプルにおいては、本発明の粒子 2 種の方がおよそ一桁の差を回収効率の面で示しており、本発明において用いられる粒子が優れることが示される。

【 0 0 5 5 】

比較例（細孔直径が 500 nm、細孔容積が $5000 \text{ mm}^3 / \text{g}$ よりも大きい場合）

本発明において、使用する磁性粒子が、500 nm よりも大きい細孔直径および／または、 $5000 \text{ mm}^3 / \text{g}$ よりも大きい細孔容積を持つ場合には、粒子内部の空隙が大きくなりすぎ、核酸以外の夾雑物が多量に粒子内部に留まる可能性があるため好ましくないことが考えられる。加えて、500 nm よりも大きい細孔直径は、粒子直径のかなりの部分を占めるため、粒子自体がもろくなり構造を維持できないという可能性を含む。従って、本発明の方法においては、上記したように 50～500 nm の細孔直径、 $200 \sim 5000 \text{ mm}^3 / \text{g}$ の細孔容積ならびに 0.5～15.0 μm の粒子直径をもつ磁性粒子を使用する必要がある。

【 0 0 5 6 】

【発明の効果】

上述したように、本発明における表面細孔直径 50～500 nm、細孔容積 $200 \sim 5000 \text{ mm}^3 / \text{g}$ 、粒子直径 0.5～15.0 μm である磁性シリカ粒子を使用することで、生物材料から高い回収率で核酸を抽出および単離することが可能となる。特に全血試料のような夾雑物質を多量に含む材料からの核酸抽出においては、従来の粒子担体と比べて飛躍的な効果がみられる。

【 0 0 5 7 】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：24

配列の形：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..24

特徴を決定した方法：S

他の特徴：腸炎ビブリオTDH (Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の102番目から125番目のヌクレオチド配列と相同的な配列を有する。

配列

CCCCGGTTCT GATGAGATAT TGTT

24

【0058】

配列番号：2

配列の長さ：51

配列の形：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..51

特徴を決定した方法：S

他の特徴：腸炎ビブリオTDH (Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の495番目から518番目のヌクレオチド配列と相補的な配列を有する。またT7-RNAポリメラーゼのプロモーター配列を持つ。

配列

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC AATATATTAC CACTACCACT A

51

【0059】

配列番号：3

配列の長さ：26

配列の形：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..26

特徴を決定した方法：S

他の特徴：腸炎ビブリオTDH (Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の339番
目から364番目のヌクレオチド配列と相同的な配列を有する。

配列

CGGTCATTCT GCTGTGTTTCG TAAAAT

26

【0060】

配列番号：4

配列の長さ：24

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..24

特徴を決定した方法：S

他の特徴：腸炎ビブリオTDH (Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の254番
目から277番目のヌクレオチド配列と相同的な配列を有する。

配列

CAGGTACTAA AXGGTTGACA TCCT

24

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 核酸を含有すると考えられる材料から核酸を抽出および単離する際に、臨床検体のような多量の夾雑物質を含む試料から、効率よく核酸を抽出する方法を提供する。

【解決手段】 核酸に対して結合性を有する粒子担体を用いて核酸を含有すると考えられる材料からの核酸の抽出方法において、該粒子担体が0.5～15.0 μm の粒子直径、50～500 nmの細孔直径、および200～5000 mm^3 / gの細孔容積を有することを特徴とする核酸の抽出方法。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003160]

1. 変更年月日 1990年 8月10日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
氏 名 東洋紡績株式会社